

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-161559

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)8月23日

G 01 N 33/50

P-8305-2G

C 07 H 21/04

7252-4C

G 01 N 33/58

8305-2G ※審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑮ 発明の名称 核酸の塩基配列決定装置

⑯ 特 願 昭59-15226

⑰ 出 願 昭59(1984)2月1日

⑱ 発 明 者 神 原 秀 記 国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑲ 発 明 者 岡 田 修 身 国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑳ 発 明 者 菱 沼 文 男 町田市南大谷字11号916番地の2 株式会社三菱化成生命科学研究所内

㉑ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

㉒ 出 願 人 三菱化成工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

㉓ 代 理 人 弁理士 高橋 明夫 外1名

最終頁に続く

明 細 書

発明の名称 核酸の塩基配列決定装置

特許請求の範囲

1. 各塩基の部位で種々の長さに切断された核酸のフラグメントが注入される槽と、前記フラグメントをその分子量に対応した速度で前記槽内で移動させる手段と、前記フラグメントの移動経路上に設けられ前記フラグメントを検出する手段とを備えたことを特徴とする核酸の塩基配列決定装置。
2. 前記槽が電気泳動槽であり、前記移動させる手段が前記フラグメントに電気泳動力を与える泳動駆動電源であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の核酸の塩基配列決定装置。
3. 前記フラグメントは放射性物質でラベルされており、前記検出手段は放射線検出器であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の核酸の塩基配列決定装置。
4. 前記フラグメントは蛍光物質でラベルされており、前記検出手段は光検出器であることを特

徴とする特許請求の範囲第1項に記載の核酸の塩基配列決定装置。

5. 前記検出手段は4箇以上設けられることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の核酸の塩基配列決定装置。
6. 1個の前記検出手段は複数種の前記フラグメントの検出を行なうことを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の核酸の塩基配列決定装置。
7. 各塩基の部位で種々の長さに切断された核酸のフラグメントが注入される槽と、前記フラグメントをその分子量に対応した速度で前記槽内で移動させる手段と、前記フラグメントの移動経路上に設けられ前記フラグメントを検出する手段と、前記検出手段からの検出信号に基づいて、フラグメントの塩基配列を解読する手段とを備えたことを特徴とする核酸の塩基配列決定装置。
8. 前記槽が電気泳動槽であり、前記移動させる手段が前記フラグメントに電気泳動力を与える泳動駆動電源であることを特徴とする特許請求

の範囲第7項に記載の核酸の塩基配列決定装置。

9. 前記フラグメントは放射性物質でラベルされており、前記検出手段は放射線検出器であることを特徴とする特許請求の範囲第7項に記載の核酸の塩基配列決定装置。
10. 前記フラグメントは蛍光物質でラベルされており、前記検出手段は光検出器であることを特徴とする特許請求の範囲第7項に記載の核酸の塩基配列決定装置。
11. 前記検出手段は4箇以上設けられることを特徴とする特許請求の範囲第7項に記載の核酸の塩基配列決定装置。
12. 1個の前記検出手段は複数種の前記フラグメントの検出を行なうことを特徴とする特許請求の範囲第7項に記載の核酸の塩基配列決定装置。

発明の詳細な説明

〔発明の利用分野〕

本発明は、DNA（デオキシリボ核酸）あるいはRNA（リボ核酸）などの核酸における塩基配列を決定する装置に関する。

- (3) 両末端がラベルされたDNAフラグメントの二本鎖を分離して、片方の末端のみが ^{32}P でラベルされた一本鎖DNAフラグメントを調製する。あるいは両末端がラベルされたDNAフラグメントを制限酵素で切断した後、DNA断片を分離して、片方の末端のみが ^{32}P でラベルされたDNAフラグメントを調製する。
- (4) 上記で得た、片方の末端が ^{32}P でラベルされたDNAフラグメントに、DNA上の塩基Gを修飾する化学物質を作用させ、ついで切断用の化学物質を作用させて、修飾された塩基Gの部位で切断する。切断は各DNAフラグメントについて平均一回生起するようにする。こうすると、第1(b)図に示すように、 ^{32}P でラベルされた一端を含みかつ他端が塩基Gの部位で切断された種々の長さのDNAフラグメントが得られる。この場合、第1(c)図に示すように、 ^{32}P にラベルされた一端を含まないDNAフラグメントも同時に得られるが、後に述べるように ^{32}P から放射される放射線を計測するのでこれらは

〔発明の背景〕

遺伝子工学の進歩に伴ない、遺伝情報を含んだDNAあるいはRNAの迅速な解読が必要となってきた。例えば、DNA上には、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)の4種類の塩基が配列され、遺伝情報はこれら塩基の配列で決定される。そこで、生体における形質発現とDNA上の塩基配列との関係について精力的に研究がなされている。そのためにはDNA上の塩基配列を迅速に決定することが必要で、現在までいくつかの決定方法が提案されている（「細胞工学」Vol. 1, No. 1, No. 2 (1982)）。

これらの提案された方法の中で最も広く用いられているのが次に説明するMaxam-Gilbert法によるDNA塩基配列の決定方法である。この方法では、次のステップによって決定される。

- (1) 配列決定をしようとするDNAのフラグメントをまず分離する。
- (2) 分離されたDNAフラグメントの両末端を放射性リン(^{32}P)でラベルする。

障害にならない。

- (5) 同様のことを他の塩基A、C、Tについて個々に行なう。

なお、塩基Aと塩基Tについては、これらの部位に夫々特異的に作用する適切な化学物質がない。それゆえ、塩基Aの部位の切断には、例えば塩基Gと塩基Aの双方に作用する化学物質を用いて、塩基Gの部位及び塩基Aの部位での切断処理(G+A)を行い、塩基Gの部位で切断されたDNAフラグメントのパターンが存在しない場合を、塩基Aの部位で切断されたDNAフラグメントとする。同様に塩基Tの部位の切断の場合には、例えば塩基Cと塩基Tの双方に作用する化学物質を用いて、塩基Cの部位及び塩基Tの部位での切断処理(C+T)を行い、塩基Cの部位で切断されたDNAフラグメントのパターンが存在しない場合塩基Tの部位で切断されたDNAフラグメントとする。こうして一端が ^{32}P によってラベルされ、かつ他端がそれぞれ塩基G、G+A、C+T、Cの部位で切

断された4種類のDNAフラグメントのグループを得る。

- (6) これらのDNAフラグメントを各種類ごとに一枚の電気泳動板(図示せず)上に並べて同時に泳動させる。
- (7) 適当な時間だけ泳動させた後、ゲルに写真乾板を密着させ、 ^{32}P による放射線に感光させる。写真乾板には、塩基G, G+A, O+T, Oで切断されたフラグメントに対応した4本の帯状のパターンが得られる。DNAフラグメントは、その塩基数に応じて泳動速度が異なる。塩基数が少なく短かいものほど速く泳動するので、一端から他端へ速く移行する。
- (8) 最後に、塩基G, G+A, O+T, Oで切断されたフラグメントを短かい方から読み取っていくと、 ^{32}P でラベルした末端側からDNA上の塩基配列を順次決定できる。

この方法は、放射性リンを使用する必要があること、電気泳動は数時間でできるが写真乾板へ感光させるのに約一昼夜かかること、一回に

約200ないし300塩基程度までしか決定できない不便さがあることなどの問題があった。

(発明の目的)

本発明の目的は、上記の問題点に鑑み、短時間で塩基配列を容易に決定しうる装置を提供することにある。

(発明の概要)

本発明は、上記の目的を達成するため、その特徴とするところは、各塩基の部位で種々の長さの切断された核酸のフラグメントが注入される槽と、前記核酸のフラグメントをその分子量に対応した速度で前記槽内で移動させる手段と、前記核酸のフラグメントの各移動経路上に設けられ前記核酸のフラグメントを検出する手段とを備えた核酸の塩基配列決定装置にある。

本発明の他の特徴は、各塩基の部位で種々の長さの切断された核酸のフラグメントが注入される槽と、前記フラグメントをその分子量に対応した速度で前記槽内で移動させる手段と、前記フラグメントの各移動経路上に設けられ前記フラグメン

トを検出する手段と、前記検出手段からの検出信号に基づいて、フラグメントの塩基配列を解説する手段とを備えた核酸の塩基配列決定装置にある。

(発明の実施例)

以下、本発明の一実施例を第2図および第3図に基づいて説明する。

まず第一に、測定しようとするDNAをいくつかのフラグメントに分割する。このDNAの分割は、DNA上の特定の塩基配列部位を認識して切断することができる制限酵素を用いて行なわれる。この制限酵素には、複数個(4個、6個等)の塩基配列を認識して切断するようなものがある。こうして形成されたフラグメントを F_1, F_2, \dots, F_n と呼ぶ。これらのDNAフラグメントの塩基配列を決定することが課題である。

次に、各DNAフラグメントを分離精製した後、前述の従来法に準じ処理して、片方の末端が ^{32}P で、あるいは蛍光物質でラベルされたDNAフラグメントを調製する。

次に、4種の塩基G, G+A, O+T, Oを特

異のあるいは選択的に修飾する化学物質によって修飾した後、その修飾部位を選択的に切断する化学物質によって部分切断する。

上記のフラグメント F_i のうち塩基Gの部位を部分切断したものを F_{iG} と呼ぶこととする。フラグメント F_{iG} の中には、一端がラベルされ他端が塩基Gの種々の部位でそれぞれ切断されたフラグメントおよび、両端とも塩基Gの種々の部位で切断され、ラベルされていないフラグメントが含まれる。これらのうち、一端がラベルされたものだけに注目すると、一端がラベルされ、他端が種々の塩基G部位で一回切断された大小のフラグメントのセットができる。同様に塩基G+A, O+T, Oについても大小のフラグメントのセットができる。

次に、これら4種類のフラグメント $F_{iG}, F_{iG+A}, F_{iO+T}, F_{iO}$ のセットを電気泳動槽に注入して分離を行なう。大小の各フラグメントは、その長さによって泳動速度が異なるので分離され、同じ長さのものは同速度で泳動する。従来法では、

ここで、十分に泳動させた後に写真乾板を用いてバンドを転写し、そのパターンを分析することによって塩基配列を決定していた。本発明では、泳動を継続させながら、その泳動路上の特定箇所を通過する放射線バンドあるいは蛍光物質でラベルされたバンドを検出する。

第2図は、電気泳動槽と本発明による検出器、データ処理装置、出力器などを備えた塩基配列決定装置を示している。電気泳動槽1の両端には、それぞれ正負の電極2A、2Bを配置し、両電極2A、2B間に電圧をかける泳動駆動電源3を設置する。電気泳動槽1の上面には、分離板4が設けられる。一端が塩基G、G+A、O+T、Oで切断された4種のフラグメント F_{10} 、 F_{10+A} 、 F_{10+T} 、 F_{10} の泳動路上で分離板4の所定位置4箇所に検出器5(イ)、5(ロ)、5(ハ)、5(ニ)を設ける。検出器の数は4個に限らず、5個の場合もあり、この場合には1個はレフアレンス用として用いられる。又、4個を1組として複数組設けてもよく、5個を1組としてそれを複数組設けても

よい。この検出器は、DNAフラグメントの一端におけるラベルが ^{32}P である場合には放射線検出器であり、ラベルが蛍光物質による場合には光検出器である。なお、放射線の強度あるいは光の種類などを変えて各種のフラグメントの種類を識別できるようにすれば1個の検出器でもよい。このように、1個の検出器が複数種のフラグメントが通過したことを検出してもよい。これらの検出器5(イ)、5(ロ)、5(ハ)、5(ニ)は泳動しながら通過する各フラグメントを検知し、検知信号を出す。その状態を第3図に基づいて説明する。

第3図において、各フラグメント F_{10} 、 F_{10+A} 、 F_{10+T} 、 F_{10} の泳動路上の検出器5(イ)、5(ロ)、5(ハ)、5(ニ)による検知信号は増幅器6で増幅される。増幅信号は時間の経過とともに増幅器6から第3(b)図に示すような信号として送り出される。信号強度のピーク部分は、各検出器5(イ)、5(ロ)、5(ハ)、5(ニ)がそれぞれ塩基G、G+A、O+T、Oのフラグメントの泳動を検知したことを示している。

次に、この増幅信号が第2図に示すデータ処理装置7に入力されて、解読されて塩基配列が決定される。第3(b)図に示す信号のうち、図中下部に位置するピークは、短時間で速く泳動したフラグメントを示し、長さが短かく分子量の小さいDNAフラグメントを検知したことを意味している。そこで、長さが1塩基変化する毎に検出時間が異なるので、短時間であらわれるピークから順次読むことにより塩基配列を決定することができる。たとえば、第3(b)図に示す信号については、フラグメント F_{10} のラインからの信号が最初に出てくるので末端は塩基Gであり、次いで塩基A、G、O、A、T、Oと順次配列が決定されていく。これらの出力はデータ処理装置7内で整理された後、配列順に、出力装置8、例えばプリンタによってGAGCATOなどの文字で出力される。

なお、核酸の塩基配列決定装置としては、検出手段を備えていればよく、前記の増幅器、データ処理装置、出力装置などは所望により備えることもできる。

(発明の効果)

本発明によれば次のような効果がある。

- (1) 従来のように電気泳動パターンを写真に撮る必要がなく、短時間で、しかも泳動を継続しながら塩基配列を決定することができる。
- (2) 従来法では電気泳動に要する時間に非常に注意を要していた。すなわち、時間が短かすぎると十分にDNAフラグメントが分離しないのでせいぜい100塩基程度しか解読できず、時間が長すぎると小さいDNAフラグメントがゲルの終端に到達してしまい読みとれなくなってしまい。そこで、何段かに分けて泳動させるという手間がかかっていた。本発明によれば、小さいフラグメントからゲルによる分離能の限界に至る程大きいフラグメントまでの測定をすることができる。
- (3) 以上のことはRNAについても言える。

図面の簡単な説明

第1(a)図は、一端がラベルされたDNAフラグメントを模式的に示した図である。第1(b)図は、

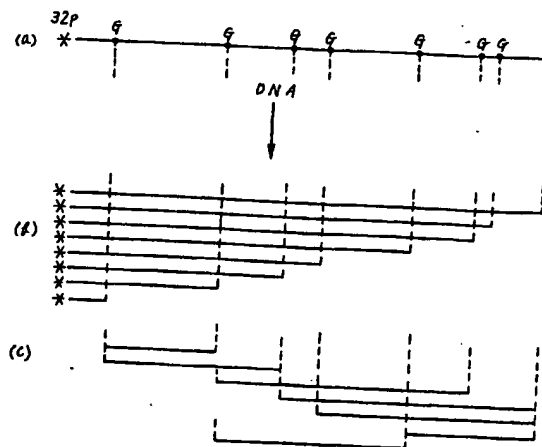
塩基 G に特異な反応によって第 1 (a) 図に示すフラグメントが塩基 G の部位でさらに切断された DNA フラグメントを模式的に示した図である。第 1 (c) 図は、第 1 (b) 図に示す DNA フラグメントを除くフラグメントを示した図である。第 2 図は、本発明の一実施例を示す図である。第 3 図は、第 2 図中の検出器と増幅器から出力された信号を示す図である。

1…電気泳動槽、2 A, 2 B…電極、3…泳動駆動電源、4…分離板、5 (イ), 5 (ロ), 5 (ハ), 5 (ニ)…検出器、6…増幅器、7…データ処理装置、8…出力装置。

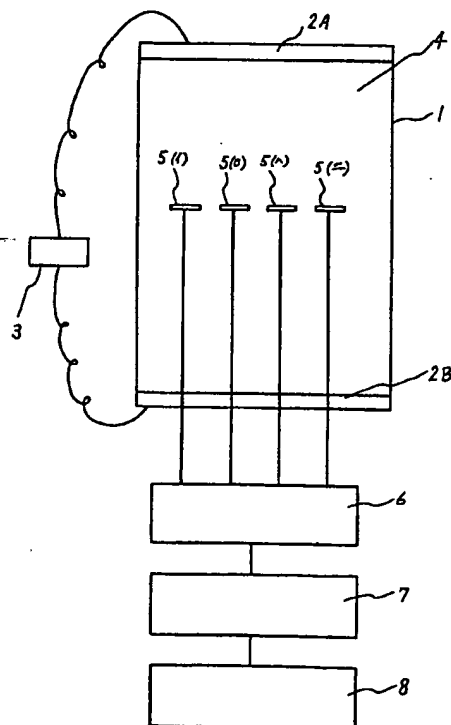
代理人弁理士 高橋明夫



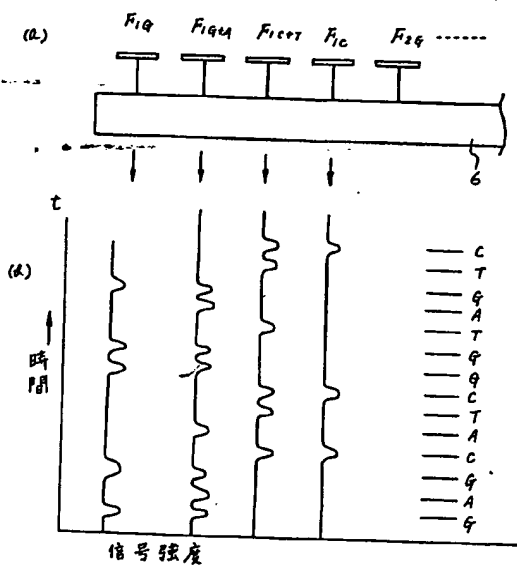
第 1 図



第 2 図



第 3 図



第1頁の続き

⑥Int.Cl.⁴

// C 12 N 15/00
G 01 N 27/28

識別記号

庁内整理番号

7115-4B
A-7363-2G

⑦発 明 者 柴

忠 義

町田市南大谷字11号916番地の2 株式会社三菱化成生命
科学研究所内